微孢子虫和狄斯瓦螨分别侵染后的意蜂血淋巴蛋白质含量变化

周　婷，姚　军，王　强，王风忠
（中国农业科学院蜜蜂研究所，北京　100093）

摘要：微孢子虫 *Nosema apis* 和狄斯瓦螨 *Varroa destructor*（Acari：Varroidae）均为危害意蜂 *Apis mellifera* 的重要寄生虫，该文对其危害后意蜂血淋巴蛋白质含量的变化进行了研究。用考马斯亮蓝法测定了意蜂受侵染后血淋巴的蛋白质总量，并用高压超薄层等电点聚焦法进行血淋巴蛋白质分类。结果显示，病蜂血淋巴蛋白质总量，在人工感染微孢子虫后 1～10 天呈上升趋势，然后逐渐下降，感染后 12～27 天保持在感染前意蜂血淋巴总蛋白质含量水平以下。螨侵染后意蜂血淋巴蛋白质含量明显增高，与健康意蜂相比差异极显著。高压超薄层等电点聚焦分析表明：狄斯瓦螨自然侵染意蜂后，意蜂血淋巴蛋白质组分与健康对照组相比发生了明显改变。这些结果提示，意蜂对于微孢子虫或狄斯瓦螨的侵染产生了一定的免疫反应。

关键词：意蜂；微孢子虫；狄斯瓦螨；血淋巴总蛋白质；免疫反应
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)04-0530-04

Changes in content of hemolymph protein in the honeybee (*Apis mellifera* L.) workers infected by *Nosema apis* and *Varroa destructor* respectively

ZHOU Ting，YAO Jun，WANG Qiang，WANG Feng-Zhong (Institute of Apicultural Research，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100093，China)

Abstract: The changes in content of hemolymph protein in the honeybee (*Apis mellifera* L.) workers infected by spores of *Nosema apis* and the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) respectively were assayed. The content of hemolymph protein was detected using Bradford method. The component difference of hemolymph proteins between the healthy (CK) and the infected bees were analyzed using high voltage isoelectric focusing electrophoresis (IEF). The results showed that the content of hemolymph protein of the bees tended to rise progressively within 10 days after being infected by *Nosema* spores，and then decreased gradually，till reaching a level below the content before being infected in 12－27 days after infection. The content of hemolymph protein of the bees infected by *V. destructor* was significantly higher than that of the control，and the components of hemolymph proteins were also different between the healthy and infected bees as indicated by IEF results. The results suggested the honey bees developed immunological reaction in some degree to *N. apis* or *V. destructor* after their infection.

Key words: *Apis mellifera*; *Nosema apis*; *Varroa destructor*; hemolymph protein; immunological reaction

昆虫没有淋巴细胞系统，不能进行完整的特异性免疫，但每一种昆虫根据自己的生活环境，都建立起一套适合自身生存和发展的防御机能(Gunski，1995a，1995b；周婷，1996；张复兴，1998)。已有大量研究表明，当异源物质侵入昆虫时，能诱导其血淋巴中有防御能力的肽类和蛋白质增加，这类抗菌肽类和蛋白质虽然与诱导源之间不存在任何特异关系，但对异源物具有杀灭或中和作用，而且这种功能可以遗传给后代(Wyatt and Pan，1978；翟朝阳，1996；张青文，2000；徐进署和张双全，2002；安春菊等，2003)。

关于意蜂 *Apis mellifera* 防御系统的研究报道较少，1977 年俄罗斯的科研人员将细菌注入意蜂血淋巴，5 h 后吸取血淋巴接种到肉汤平板上，培养发现使意蜂致病的病原菌仍在繁殖，而非致病菌完全被消灭，而且这时意蜂血淋巴没有吞噬现象，说明血淋

基金项目：中国农业科学院院长基金项目(9932-17)
作者简介：周婷，女，1958 年 4 月生，江苏无锡人，在读博士，研究员，研究方向为蜜蜂病理学，E-mail：ztapis@263.net
收稿日期 Received：2003-10-23；接受日期 Accepted：2004-05-02

巴中有防御物质的产生（内部资料）。Casteels 等（1989，1990）曾从意蜂血淋巴中先后分离了两类抗菌肽，定名为意蜂肽 apidaecins 和 abaecin。Gunski（1995）发现细菌侵入意蜂体内后能诱导意蜂血淋巴内抗菌肽类和蛋白质的增加。

我们用考马斯亮蓝法测定了意蜂受微孢子虫 *Nosema apis* 人工感染后以及狄斯瓦螨 *Varroa destructer*（蜱螨目：瓦螨科 Varroidae）自然侵染后其血淋巴的蛋白质总量，并用高压等电点聚焦法进行意蜂血淋巴蛋白质分类。力图使意蜂防御系统的研究工作向前迈进一步，为寻求意蜂病虫害防治新途径提供依据。

1　材料与方法

1.1　微孢子虫人工感染意蜂实验

1.1.1　材料：实验用意蜂为本所饲养的有 2 框刚出房幼蜂的健康蜂群；自制微孢子虫悬浮液，浓度为每毫升悬浮液中有 5.5×10^7 个微孢子（5.5×10^7/mL）。

1.1.2　蜂群感染方法：将浓度为 5.5×10^7/mL 的悬浮液与 50% 的白糖水 1:1 混合，每次以 20 mL 剂量饲喂实验幼蜂群。每日 1 次，连续饲喂 21 次。

1.1.3　意蜂血淋巴收集方法：开始采用的是 Abrol（1995）的方法，即将意蜂低温冷冻 5 min，固定在蜡盘上，在其腹部第 5～6 节之间打一个洞，用毛细管吸取血淋巴。但发现用这种方法收集血淋巴时容易被粪便、花粉和蜜囊里的蜜污染。因此，改进为将意蜂 -20℃冷冻 2～3 min 后，用剪刀剪去意蜂头后部（注意不要剪断食管），1～2 min 后血淋巴会自动涌出，用毛细管吸取。这种方法简便易行，且不易被污染。

Gunski（1995a）报道在没有外界异源物质侵入的情况下，成年意蜂血淋巴的蛋白质水平保持在相对稳定的水平，所以本实验的分组采用感染前后自身对照的方法，保证实验组和对照组为同一群意蜂。在意蜂感染微孢子虫前，每日取 1 份该群健康幼蜂的血淋巴样品，连续取 3 天；从感染之日起，每日取样一份，连续取 27 天。约 10～12 只意蜂血淋巴之和为一样品，加入一只小离心管中，同时加入微量苯基硫脲，防止血浆中酚氧化酶活化而使血淋巴黑化，共采集样品 30 份。离心除去血细胞，样品 -20℃冰箱保存备用。

收集血淋巴的同时，每天用光学显微镜逐只检查被采血浆意蜂中肠感染情况。血淋巴总蛋白质测定采用考马斯亮蓝染色法，牛血清蛋白作标准曲线，每个数据为 3 个重复样品的平均数。

1.2　狄斯瓦螨自然侵染意蜂实验

1.2.1　材料：对照组健康意蜂群为本所饲养的幼年工蜂，螨侵染组意蜂为购自安徽省黄山的被狄斯瓦螨严重侵染的意蜂群。

1.2.2　方法：血淋巴收集方法同 1.1.3 节。采集本所饲养的健康意蜂群出房 1～2 天的幼年工蜂血淋巴样品 12 份；采集被狄斯瓦螨严重侵染意蜂出房 1～2 天的幼年工蜂血淋巴样品 12 份。为了准确得到螨侵染后意蜂血淋巴，首先寻找蜂体上有 1 只以上雌螨的幼蜂，再进行采血。

意蜂血淋巴蛋白质总量测定完毕后，以上 10 份样品继续 -20℃保存，用于高压超薄层等电点聚焦分析。

1.3　意蜂血淋巴总蛋白质含量测定方法

参照 Bradford（1976）方法。仪器为上海生产的 721 分光光度计。

1.4　意蜂血淋巴蛋白质分类

采用高压超薄层等电点聚焦法。电泳仪：LKB MULTIPHOR Ⅱ Electrophoresis Unit；冷却设备：LKB 2219 MULTITEMP Ⅱ Thermostatic Circulator。

上样：血淋巴原液 4 μL。电泳条件：循环水温度 4℃，电泳仪电压 2 000 V，电泳仪功率 25 W，最后 0.5 h 功率加大至 30 W，电泳时间为 2.5～3.0 h。

2　结果

2.1　感染微孢子虫后意蜂血淋巴总蛋白质含量变化

图 1 中 1～3 天为感染前意蜂血淋巴总蛋白质含量，分别为 21 mg/mL、24.5 mg/mL 和 21 mg/mL；4～30 天为感染后意蜂血淋巴总蛋白质含量。在感染后的 1～10 天意蜂血淋巴总蛋白质含量呈上升趋势，第 10 天达 34.5 mg/mL；随后其含量逐渐下降，第 12～27 天保持在感染前意蜂血淋巴总蛋白质含量水平以下，平均为 13.2 mg/mL。

2.2　狄斯瓦螨侵染后意蜂血淋巴总蛋白质的含量及分类

2.2.1　意蜂血淋巴总蛋白质含量测定结果：对照组健康意蜂和螨侵染组意蜂血淋巴总蛋白质含量分别为（10.2 ± 3.417）mg/mL 和（19.25 ± 6.638）mg/mL，经 t 检验差异达极显著水平（$P<0.01$）。结果表明，螨侵染后意蜂的血淋巴总蛋白质总量明显高于

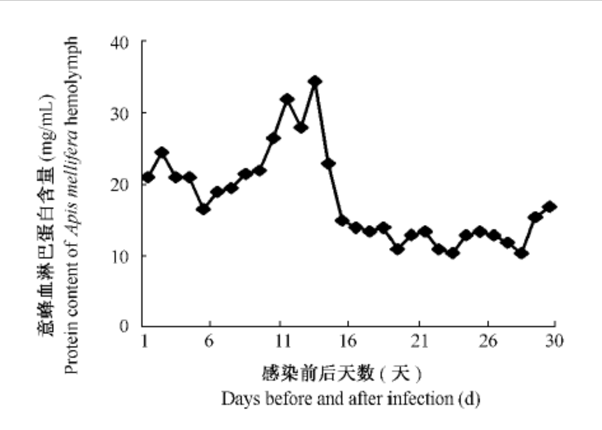


图1 感染微孢子虫前后意蜂血淋巴蛋白质含量的动态

Fig. 1 Dynamics of hemolymph protein content of *Apis mellifera* workers before and after being infected by *Nosema apis*

健康意蜂的,可能说明螨侵染后刺激意蜂产生了防御反应。

2.2.2 血淋巴蛋白质分类:高压等电点聚焦结果(图2)显示:C泳带位置上实验组有一条清晰的带,而对照组相应部位的这条带很不清晰,提示螨侵染后意蜂血淋巴中的某种蛋白质明显增高,这种实验组增高的一致性,可以认为可能与意蜂防御功能有关。同时发现,在A泳带位置,对照组有一条较清晰的带,而实验组的不清晰,可能说明螨侵袭意蜂后,意蜂除表现较强的防御功能外,由于螨对血淋巴的吸食,会使意蜂正常血淋巴中的某些蛋白质组分降低。

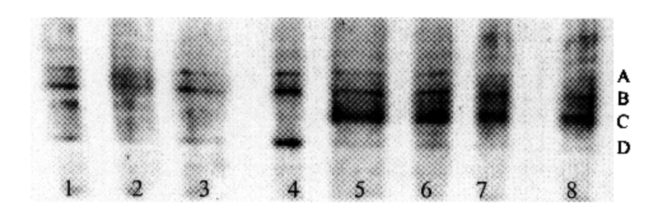


图2 对照组健康意蜂和螨侵染组意蜂血淋巴总蛋白质高压等电点聚焦结果

Fig. 2 The result of high voltage isoelectric focusing electrophoresis of hemolymph protein of *Apis mellifera* workers not infected (CK) or infected (Treatment) by *Varroa destructor*

1~4. 对照组 CK; 5~8. 螨侵染组 Treatment; A~D. 泳带 Bands.

3 讨论

本研究结果表明,意蜂血淋巴总蛋白质含量在人工感染微孢子虫后1~10天呈上升趋势,然后逐渐下降,在感染后第12~27天总蛋白质含量低于感染前的水平。但第23届国际养蜂学大会资料曾报道,连续10天测定感染微孢子虫后意蜂血淋巴蛋白质含量,发现血淋巴蛋白质含量一直表现为减少的过程。值得注意的是,该实验所用意蜂是自然感染微孢子虫的病蜂,已过了潜伏期,所以血淋巴总蛋白质含量增高的阶段可能未包括在内。该结果与我们的后期实验结果吻合,表明感染微孢子虫后,最终病蜂血淋巴总蛋白质含量是降低的。我们认为:血淋巴总蛋白质含量降低的原因,是由于微孢子虫寄生后引起意蜂中肠上皮细胞破坏、脱落,肠壁溃烂,肠道对蛋白质和其他营养物质的吸收功能降低所致。意蜂血淋巴总蛋白质含量的降低并不表示微孢子虫感染后意蜂的防御反应功能的减弱或抑制。如果能够进一步测定感染微孢子虫后病蜂血淋巴蛋白质特定成分的变化,将有助于明确微孢子虫感染后意蜂防御反应功能的动态变化。孢子虫感染后引起的病蜂血淋巴总蛋白质含量降低,有可能影响意蜂的生长发育(任璐等,2004)。安春菊等(2003)用针刺、带菌针刺、热激和超声等方法处理3龄家蝇幼虫,结果表明,4种处理均能诱导家蝇幼虫产生抗菌物质。他们同时指出,家蝇幼虫在不同诱导方式下,或同一诱导方式不同诱导时间下,同一种蛋白质/多肽的表达量并不一样,但未给出这种表达量是上升还是下降,因此无法与本实验的结果进行比较。

本研究结果还表明,螨自然侵染后意蜂血淋巴蛋白质含量明显增高,与健康意蜂相比差异极显著。这一方面表明螨侵染同样可以引起意蜂的防御反应,另一方面也说明侵染的存在可持续引起意蜂的防御功能。同微孢子虫寄生于意蜂中肠上皮细胞不同,螨侵染可使意蜂的表皮损伤,所以并不出现意蜂血淋巴总蛋白质含量的降低。该结果也反过来提示微孢子虫感染引起的意蜂血淋巴总蛋白质含量的降低与意蜂肠道对蛋白质和其他营养物质的吸收功能降低有关,而不是防御功能的减弱或抑制。

为了进一步观察螨侵染是否导致某种特定的蛋白质增加从而引起意蜂防御反应,我们应用高压等电聚焦技术进行了血淋巴蛋白质分类。结果发现:C泳带位置上,实验组有一条清晰的带,对照组相应部位的这条带很不清晰,提示螨侵染后意蜂血淋巴中的某种蛋白质明显增高,这可能与意蜂防卫功能有关;同时还发现,在A泳带位置,对照组有一条较清晰的带,而实验组的这条带则不清晰,提示螨侵染意蜂后,意蜂除表现较强的防卫功能外,由于螨对血淋巴的吸食,会使意蜂正常血淋巴中的某些蛋白质组分降低。由于条件所限,未对以上蛋白质做定性

分析，也未进行意蜂血淋巴的抗菌实验，这些有待于今后进一步的工作。

致谢 本研究得到中国科学院动物研究所龚和研究员、秦启联博士；中国农业科学院品种资源研究所杨凯博士、海林客座研究员的多方指导，在此表示衷心感谢。

参 考 文 献（References）

Abrol DP，1995. Haemocytes of honey bees，*Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. and their alteration by mite parasitosis. *Indian Bee Journal*，5 791：6－7.

An CJ，Shi M，Hao YJ，Sheng CZ，Geng H，Li DS，Du RQ，2003. Inducement and activity analysis of antibacterial-related proteins/peptides in housefly larvae. *Acta Entomologica Sinica*，46（5）：545－548.［安春菊，石明，郝友进，盛长忠，耿华，李德森，杜荣骞，2003. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析. 昆虫学报，46(5)：545－548］

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*，72：248－254.

Casteels P，Ampe C，Jacobs F，Vaeck M，Tempst P，1989. Apidaecins：antibacterial peptides from honeybees. *EMBO. J.*，8：2 387－2 391.

Casteels P，Ampe C，Riviere L，van Damme J，Elicone C，Fleming M，Jacobs F，Tempst P，1990. Isolation and characterization of abaecin，a major antibacterial response peptide in the honeybee（*Apis mellifera*）. *Eur. J. Biochem.*，187：381－386.

Gunski Z，Jarosz J，1995a. Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World*，76（4）：195－205.

Gunski Z，Jarosz J，1995b. Mechanical and biochemical defences of honey bees. *Bee World*，76（3）：110－118.

Ren L，Yang YZ，Li X，Miao L，Yu YS，Qin QL，2004. Impact of transgenic *Cry1A* plus *CpTI* cotton on *Helicoverpa armigera*（Lepidoptera：Noctuidae）and its two endoparasitoid wasps *Microplitis mediator*（Hymenoptera：Braconidae）and *Campoletis chlorideae*（Hymenoptera：Ichneumonidae）. *Acta Entomologica Sinica*，47(1)：1－7.［任璐，杨益众，李瑄，苗麟，余月书，秦启联，2004. 转基因抗虫棉对棉铃虫及其内寄生蜂的双重效应. 昆虫学报，47(1)：1－7］

Wyatt GR，Pan ML（Translated by Gong H，Guan XC），1978. Development of Insect Physiology. Beijing：Science Press. 1－20.［Wyatt GR，Pan ML(龚和，关雪辰译)，1978. 昆虫生理学研究进展(3). 北京：科学出版社. 1－20］

Xu JS，Zhang SQ，2002. Advances in the research of the functions of insect antibacterial peptides against pathogenic organisms. *Acta Entomologica Sinica*，45（5）：673－678.［徐进署，张双全，2002. 昆虫抗菌肽对病原微生物作用的研究进展. 昆虫学报，45（5）：673－678］

Zhai CY，1996. The progress of studies on insect antibacterial proteins. *Acta Entomologica Sinica*，39(1)：99－104.［翟朝阳，1996. 昆虫抗菌物质研究进展. 昆虫学报，39(1)：99－104］

Zhang FX，1998. Modern Bee-Keeping Product. Beijing：China Agricultural University Press.［张复兴，1998. 现代养蜂生产. 北京：中国农业大学出版社］

Zhang QW，2000. Insect Genetics. Beijing：Science Press. 119－133.［张青文，2000. 昆虫遗传学. 北京：科学出版社. 119－133］

Zhou T，1996. Pathogenic microorganisms and defensive ability of honeybees. *Apiculture of China*，(3)：12－13.［周婷，1996. 从病理学角度谈谈病原微生物与意蜂的免疫防御机能. 中国养蜂，(3)：12－13］

（责任编辑：黄玲巧）